SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 7587.1:2010

Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 1: *Semicarbazide* (SEM)

ICS 65.150

Badan Standardisasi Nasional

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Prinsip 2
4 Peralatan 3
5 Bahan 3
6 Prosedur kerja 4
7 Perhitungan 5
8 Pengendalian mutu 5
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan 6
Lampiran B (normatif) Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis SEM 7
Lampiran C (normatif) Posisi standar SEM dan contoh pada *well* dan kurva kalibrasi standar SEM 8
Bibliografi 9

Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis SEM 7
Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar SEM 8

Tabel C.1 – Susunan standar SEM dan contoh pada *well* 8

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 1: *Semicarbazide* (SEM).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus SPT 65-05-S2 Perikanan Budidaya pada tanggal 14 September 2009 di Bandung, dihadiri oleh anggota subpanitia teknis, wakil-wakil dari unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
5. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.01/Men/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
6. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.02/Men/2007 tentang Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologis dan Pencemaran Pada Pembudidayaan Ikan.
7. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 07/DPB/HK.150.154/S4/VII/2007 tentang Batas Maksimum Residu Obat Ikan, Peptisida dan Kontaminan Pada Bahan Makanan Yang Berasal Dari Ikan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. No. 06/DPB/HK.150/S4/VII/2007 tentang Pedoman Pelaksanaan Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Desember 2009 sampai dengan 22 Pebruari 2010 dengan hasil akhir RASNI.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 1: *Semicarbazide* (SEM)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur pengujian residu antibiotik *Semicarbazide* (SEM) pada ikan dan udang dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA).

2 Istilah dan definisi

2.1
absorbansi
penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada ELISA *reader*

2.2
antibiotik
zat kimia dengan sifat antimikroba, dihasilkan oleh mikroorganisme, tumbuhan, atau hewan yang lebih tinggi dan juga secara sintetik

2.3
antibodi
molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintetis molekul ini di dalam jaringan limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

2.4
antigen
benda asing yang menyebabkan pembentukan antibodi bila dimasukkan ke dalam organisme. Antigen bisa berupa toksin dari bakteri, enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

2.5
contoh ikan dan udang
sejumlah kecil dari suatu populasi ikan/udang yang digunakan untuk pemeriksaan dan memenuhi persyaratan secara statistika

2.6
dilution factor
faktor pengenceran yang diperoleh dari penambahan volume larutan pengencer

2.7
ekstraksi
proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur

2.8
enzim
protein yang bertindak sebagai katalis biologis berfungsi mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

2.9
enzyme conjugated
enzim terikat

2.10
***enzyme linked immunoassay* (ELISA)**
teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada suatu contoh daging dari ikan/udang

2.11
evaporasi
proses penguapan yaitu proses perubahan molekul zat cair menjadi gas atau uap air

2.12
inkubasi
pemeliharaan organisme, campuran reaksi, dan semacamnya dalam lingkungan temperatur yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu agar tercapai hasil/akibat tertentu

2.13
metabolit
substansi yang memiliki ukuran molekul kecil yang merupakan produk antara maupun akhir dari suatu proses metabolisme, dan pada umumnya produk tersebut masih tetap ada pada saat akhir metabolisme

2.14
sentrifus
alat untuk mengendapkan partikel dengan berat molekul rendah dengan cara pemutaran pada kecepatan tinggi

2.15
SEM
Semicarbazide atau Semikarbasida dengan rumus molekul $NH_2.CO.NH.NH_2$ berupa zat hablur (serbuk) tanpa warna, bereaksi dengan keton dan aldehida membentuk *semikarbazon*

2.16
TMB substrate
larutan 3,3',5,5' *Tetramethyl benzidine*

2.17
well
lubang sumuran pada *microtiter plate* yang berisi antigen

3 Prinsip

Metode ini berdasarkan deteksi metabolite nitrofuran (SEM*)* pada ikan dan udang dengan prinsip *"indirect – competitive" enzyme immunoassay*. *Microtiter well* dilapisi oleh *Bovine Serum Albumin* (BSA)-*linked antigen*. SEM yang terdapat di dalam contoh berikatan dengan antigen, setelah penambahan *horseradish peroxidase* (HRP), *TMB*/*peroxidase substrate* kemudian larutan contoh diukur dengan ELISA *reader*. Nilai absorbsi berbanding terbalik dengan konsentrasi SEM di dalam contoh.

© BSN 2010

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

4 Peralatan

a) blender*;*
b) evaporator (*nitrogen evaporator*);
c) inkubator*;*
d) karet pipet *(rubber pipette bulb);*
e) labu ukur *(volumetric flask)* 100 ml dan 500 ml;
f) lemari pembeku *(freezer);*
g) *microtiter plate reader/*ELISA *reader* (panjang gelombang 450 nm/630 nm);
h) *mini mixer;*
i) pipet ukur *(graduated pipette)* 10 ml;
j) pengaduk *(homogenizer);*
k) pipet mikro *(micropipettes)* :20 µl sampai dengan 200 µl, 100 µl sampai dengan 1000 µl, 250 µl *multi-channel pipette;*
l) sentrifus;
m) *shaker*;
n) tabung reaksi *(glass test tube)* 10 ml*;*
o) tabung sentrifus polistiren (*polystyrene centrifuge tube*) 50 ml*;*
p) tabung sentrifus;
q) timbangan analitik.

5 Bahan

5.1 Bahan kimia

a) akuabides;
b) *ethyl acetate Grade Reagent* (G.R);
c) HCl G.R*;*
d) metanol G.R;
e) NaOH G.R;
f) *n-Hexane* G.R;
g) Nitrogen H.P (*High Purity*);
h) *potassium phosphate dibasic trihydrate* ($K_2HPO_4.H_2O$) G.R.

5.2 Bahan ELISA kits

a) *antibody solution;*
b) 20x *concentrated wash solution;*
c) 2x *concentrated extraction solution;*
d) *enzyme conjugated;*
e) larutan standar SEM dengan konsentrasi: 100 ng/ml;
f) *microtiter plate* yang telah dilapisi dengan *coupling antigen*;
g) *2-Nitrobenzaldehyde;*
h) larutan standar SEM (0 ; 0,1; 0,3; 0,9; 2,7; dan 8,1) ng/ml;
i) *solution A;*
j) *solution B;*
k) *stop solution.*

CATATAN Pembuatan larutan diuraikan dalam Lampiran A.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

6 Prosedur kerja

6.1 Preparasi contoh daging ikan/udang

a) lumatkan contoh (± 250 gram) dengan blender hingga homogen;
b) simpan contoh yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup;
c) jika contoh tidak langsung diuji maka simpan dalam *freezer* sampai analisa akan dilakukan.

6.2 Ekstraksi

a) Timbang 1 g homogenat contoh dalam tabung sentrifus dan tambahkan 5 ml metanol, aduk selama 5 menit, kemudian sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4500 rpm (3000 g, r = 10 cm) lalu buang seluruh lapisan bagian atas.
b) Tambahkan endapan dengan 4 ml akuabides, 0,5 ml HCl 1 M, dan 100 µl 2-*Nitrobenzaldehyde* kemudian kocok selama 1 menit dengan menggunakan *mini mixer*.
c) Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 16 jam.
d) Tambahkan 5 ml K_2HPO_4 0,1 M, 0,4 ml NaOH 1 M, 10 ml *ethyl acetate* pada setiap tabung dan dikocok selama 30 detik.
e) Sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm (3000 g, r=10 cm) selama 10 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
f) Pindahkan 5 ml *ethyl acetate* (lapisan atas) ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian dievaporasi dengan menggunakan *nitrogen evaporator* pada suhu 50 °C sampai dengan 60 °C.
g) Larutkan endapan (hasil evaporasi) yang telah mengering dengan 1 ml *n-Hexane* kemudian kocok selama 30 detik dengan menggunakan *mini mixer* dan tambahkan 0,5 ml 2x *concentrated extraction solution* kemudian dikocok kembali selama 30 detik.
h) Sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm (3000 g, r=10 cm) selama 10 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
i) Ambil 50 µl larutan pada lapisan *buffer* (lapisan bawah) untuk analisa ELISA

CATATAN Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh digambarkan pada Lampiran B.

6.3 Proses pengujian ELISA

a) Masukkan 50 µl masing-masing larutan standar SEM ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga tertinggi (Tabel C.1).
b) Masukkan 50 µl masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula.
c) Tambahkan 50 µl *antibody solution* ke dalam setiap *well* pada poin a dan b.
d) Inkubasikan *microtiter plate* dalam inkubator selama 30 menit pada suhu 37 °C.
e) Buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu.
f) Bilas *microtiter plate* dengan 250 µl 20x *concentrated wash solution* sebanyak lima kali.
g) Tambahkan 100 µl *enzyme conjugated* dan inkubasikan kembali selama 30 menit pada suhu 37 °C.
h) Buang cairan dari dalam *microtiter plate* sampai benar-benar kering dengan cara mengetukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu.
i) Cuci *microtiter plate* dengan 250 µl 20x *concentrated wash solution* sebanyak lima kali.
j) Tambahkan 50 µl *solution A* kemudian 50 µl *solution B* ke dalam setiap *well.*
k) Homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual dan inkubasikan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 15 menit dalam kondisi gelap.

© BSN 2010

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

l) Tambahkan 50 µl *stop solution* ke dalam setiap *well*, dan homogenkan secara perlahan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual.
m) Baca absorbansi setiap sumuran dengan *microtiter plate reader* (ELISA *reader*) pada panjang gelombang 450 nm dengan segera (tidak lebih dari 30 menit).

CATATAN Posisi standar SEM dan contoh pada *well* digambarkan pada Lampiran C.1.

7 Perhitungan

a) Kurva kalibrasi standar SEM dapat dibuat dari pembacaan % absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva logaritma.

$$\frac{B}{B_0}\% = \frac{Absorbansi\ standar atau\ contoh}{Absorbansi\ standar\ \ 0\,ng/ml} \times 100\ \%$$

b) Masukkan hasil pembacaan % absorbansi contoh ke dalam kurva kalibrasi standar. (Gambar C.1).
c) Nilai konsentrasi SEM pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan *dilution factor* 2,0.
d) *Dilution factor* 2,0 merupakan faktor pengenceran dari 1 gram contoh dibagi dengan 0,5 ml 2x *concentrated extraction solution.*

CATATAN Kurva kalibrasi standar SEM digambarkan pada Lampiran C.2.

8 Pengendalian mutu

Pengendalian mutu yang digunakan dengan persyaratan sebagai berikut:

a) bahan kimia berkualitas murni (*Grade Reagent* (G.R));
b) alat gelas bebas kontaminasi;
c) alat ukur yang telah dikalibrasi;
d) menyimpan bahan ELISA kit pada lemari pendingin dengan suhu 2 °C sampai dengan 8 °C;
e) kondisikan ELISA kit pada suhu kamar selama 30 menit sampai dengan 1 jam sebelum digunakan;
f) gunakan bahan analisa sebelum batas waktu kedaluwarsa.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan larutan

A.1 Larutan *dipotassium hidrogen fosfat*, K_2HPO_4 0,1 M

Bahan:

- K2HPO4.H2O G.R 22,8 g
- akuabides 1 l

Cara membuat :

Larutkan 22,8 g $K_2HPO_4.H_2O$ G.R dalam 1 l akuabides.

A.2 Larutan *asam klorida*, HCl 1 M

Bahan:

- HCl G.R (konsentrasi 36,5%) 8,6 ml
- akuabides 91,4 ml

Cara membuat:

Encerkan 8,6 ml HCl G.R (konsentrasi 36.5%) dengan akuabides sampai volume 100 ml.

A.3 Larutan *natrium hidroksida*, NaOH 1 M

Bahan:
- NaOH G.R 4 g
- akuabides 100 ml

Cara membuat :

Larutkan 4 g NaOH G.R dalam 100 ml akuabides.

A.4 Larutan 2-*Nitrobenzaldehyde* 10 mM

Bahan:
- 2-*Nitrobenzaldehyde* 15,1 mg
- metanol 10 ml

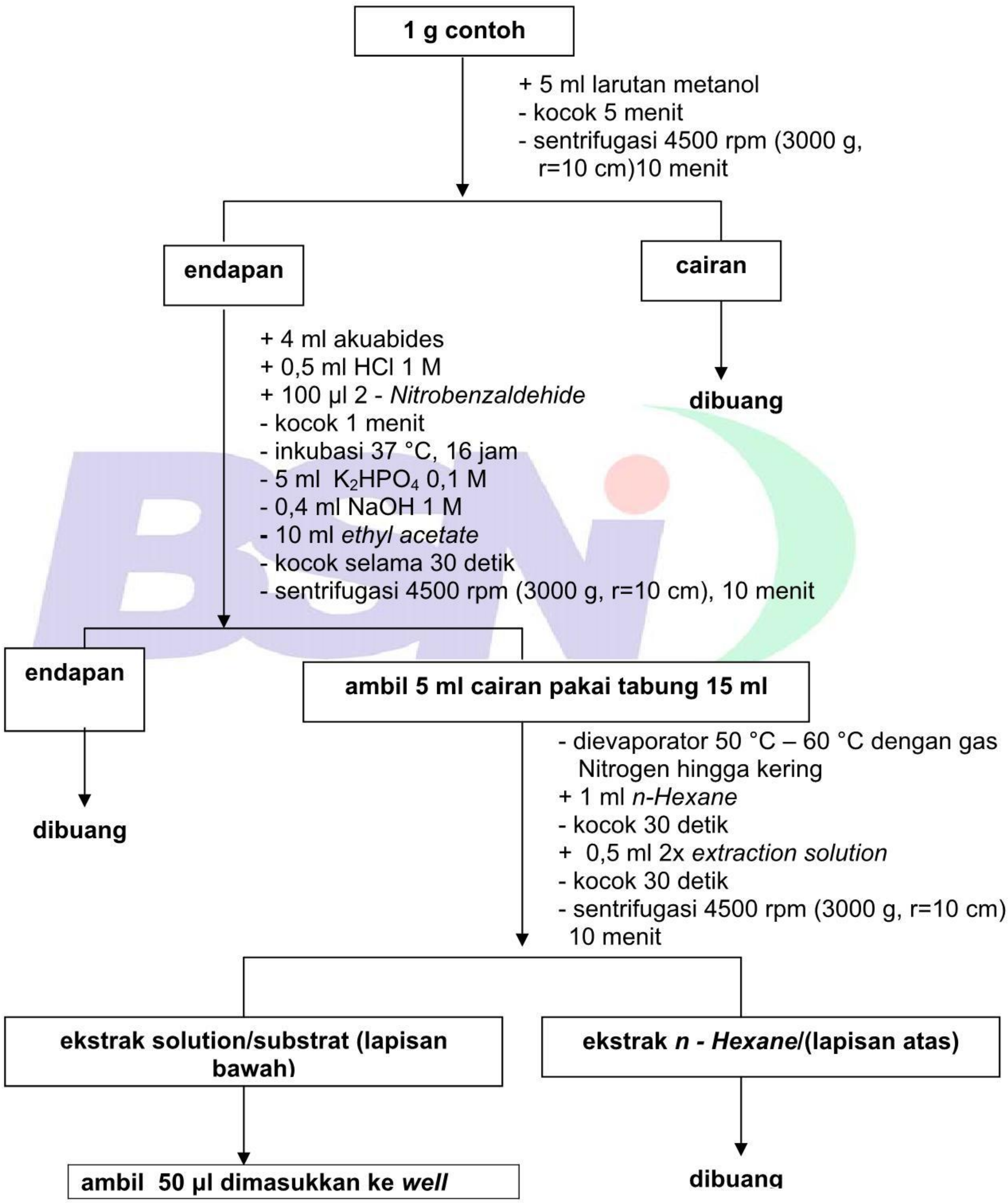
Cara membuat:

Larutkan 15,1 mg 2-*Nitrobenzaldehyde* dalam 10 ml metanol

© BSN 2010

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran B
(normatif)
Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis SEM



Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis SEM

© BSN 2010

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran C
(normatif)
Posisi standar SEM dan contoh pada *well* dan kurva kalibrasi standar SEM

C.1 Posisi standar SEM dan contoh pada *well*

Tabel C.1 – Susunan standar SEM dan contoh pada *well*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S-0	S-2,7	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
B	S-0	S-2,7	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
C	S-0,1	S-8,1	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
D	S-0,1	S-8,1	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
E	S-0,3	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
F	S-0,3	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
G	S-0,9	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42
H	S-0.9	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42

Keterangan

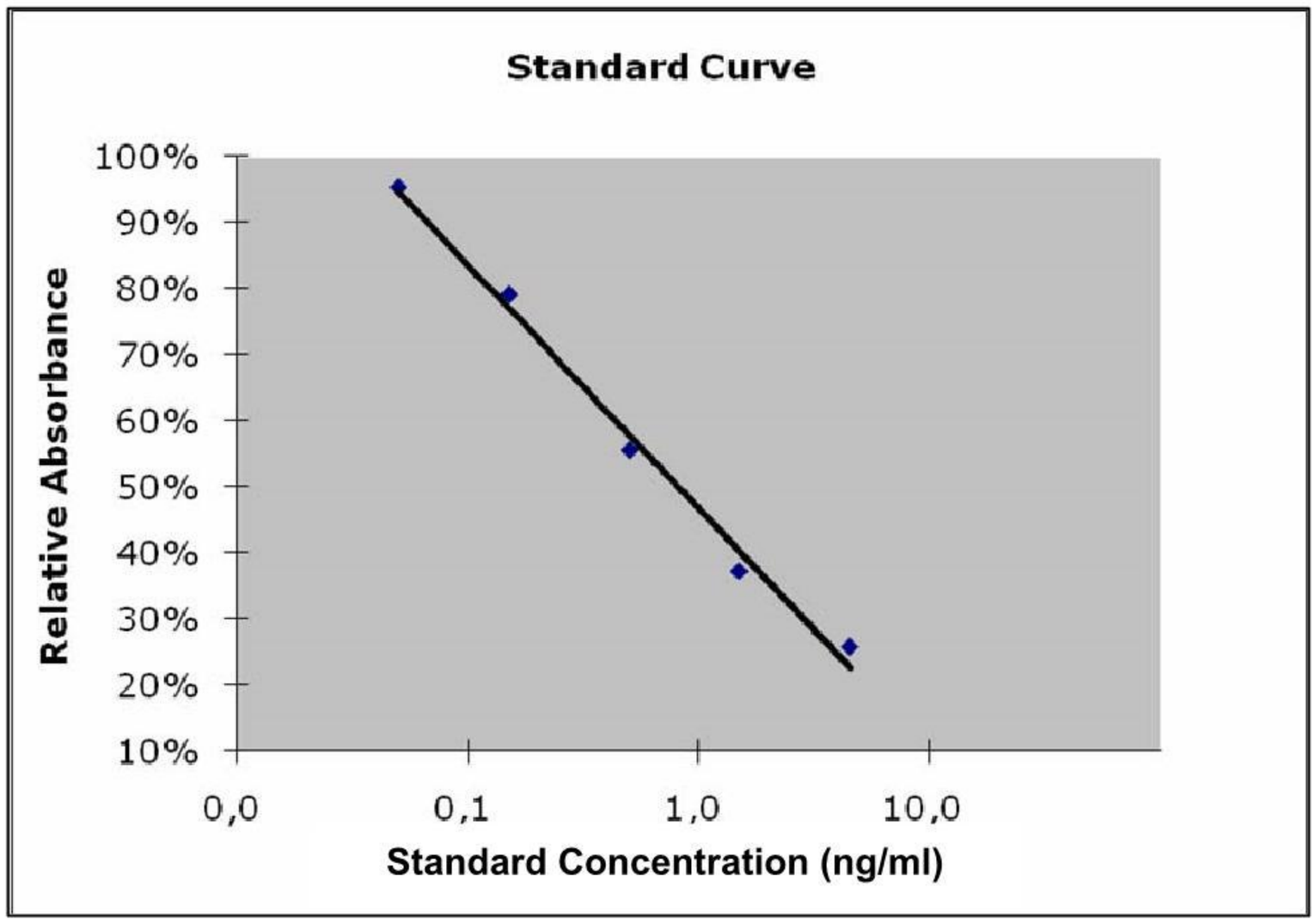
S : kode larutan standar (0; 0,1 ; 0,3; 0,9; 2,7; dan 8,1) ng/ml

C : kode larutan contoh (C1 – C42)

Lajur A-H : posisi *well* vertikal

Lajur 1-12 : posisi *well* horisontal

C.2 Kurva kalibrasi standar SEM



Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar SEM

© BSN 2010

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Bibliografi

Burgess, Graham, W. 1988. *Elisa Technology in Diagnosis and Research*. James Cook University of North Queensland.

Hadyana, Pudjaatmaka, A. 2002. *Kamus Kimia*. Balai Pustaka.

Wanger SEM *Kit Manual Catalog* H-080614-D10

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2010

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id

© BSN 2010